

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

09/980266

EPO - Munich
62

28. Juli 2000



REC'D 23 AUG 2000

WIPO PCT

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 199 27 566.1

Anmeldetag: 17. Juni 1999

Anmelder/Inhaber: BASF Aktiengesellschaft,
Ludwigshafen/DE

Bezeichnung: Verfahren zur Erhöhung der Widerstandskraft
von Kulturpflanzen gegen phytopathogene
Pilze

IPC: A 01 N 37/06

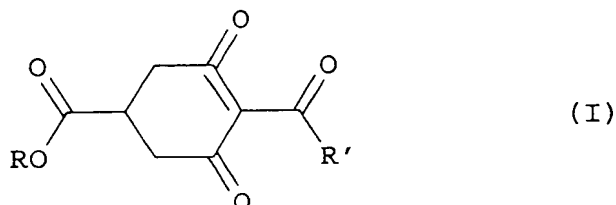
Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Anmeldung.

München, den 06. Juli 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(A) OR (B)

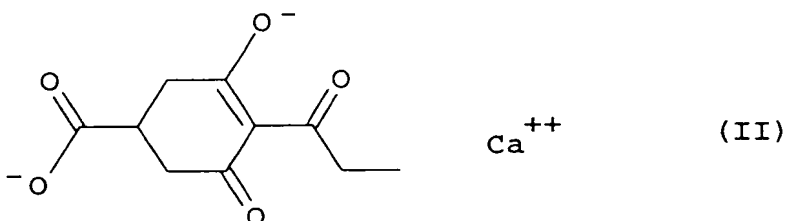
Patentansprüche

1. Verfahren zur Erhöhung der Widerstandskraft von Kulturpflanzen gegen phytopathogene Pilze, dadurch gekennzeichnet, daß die Kulturpflanzen mit wachstumsregulierenden Acylcyclohexadionen gemäß Formel I behandelt werden,

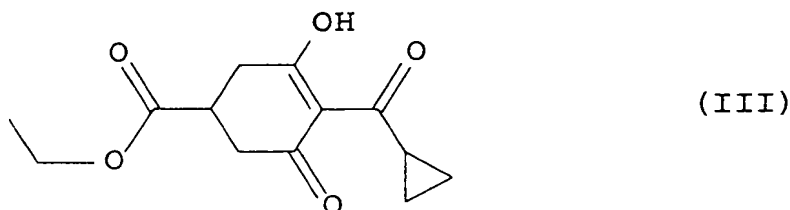


- 15 wobei R insbesondere für Wasserstoff, eine C₁-C₆-Alkyl-, C₁-C₆-Haloalkyl-, C₂-C₁₀-Alkylthioalkyl- oder Phenylgruppe (substituiert oder unsubstituiert) und R' für Wasserstoff, eine C₁-C₆-Alkyl-, C₃-C₆-Cycloalkyl-, Benzyl- (substituiert oder unsubstituiert), Phenylethyl-, Phenoxyethyl-, 2-Thienyl-
- 20 methyl-, Alkoxymethyl- oder Alkylthiomethylgruppe steht sowie geeignete Salze dieser Verbindungen.

2. Verfahren gemäß Ansprüchen 1, bei dem Prohexadion oder seine landwirtschaftlich verwendbaren Salze, insbesondere das Calciumsalz (II), in Aufwandmengen zwischen 1 und 2.000 g/ha, bevorzugt zwischen 5 und 800 g/ha, an aktiver Substanz (bezogen auf Prohexadion) eingesetzt werden.



- 35 3. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem Trinexapac-ethyl (III) in Aufwandmengen zwischen 1 und 2.000 g/ha, bevorzugt zwischen 5 und 800 g/ha, an aktiver Substanz eingesetzt wird.



45

4. Verfahren gemäß Anspruch 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Kulturpflanzen um Obstgehölze aus der Familie der Rosaceen wie Apfel und Birne, Pflaume, Zwetschge, Pfirsich, Nektarine und Kirsche sowie um Weinreben handelt.
- 5
5. Verfahren gemäß Anspruch 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Widerstandskraft gegen *Venturia inaequalis* in Apfel und Birne erhöht wird.
- 10 6. Verfahren gemäß Anspruch 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Widerstandskraft gegen *Botrytis cinerea* bei Weinreben erhöht wird.
- 15 7. Verfahren gemäß Anspruch 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Widerstandskraft gegen phytopathogene Pilze in Getreide und Erdnuß erhöht wird.

20

25

30

35

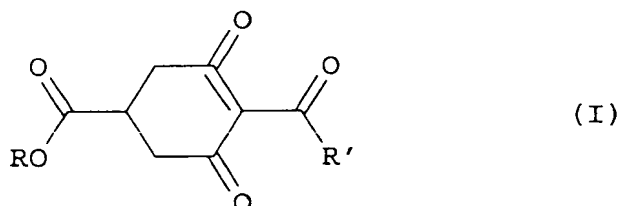
40

45

Verfahren zur Erhöhung der Widerstandskraft von Kulturpflanzen gegen phytopathogene Pilzen

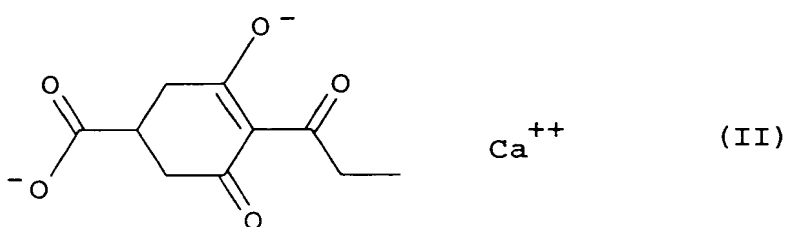
5 Beschreibung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Erhöhung der Widerstandskraft von Kulturpflanzen gegen phytopathogene Pilze, dadurch gekennzeichnet, daß die Kulturpflanzen mit
10 wachstumsregulierenden Acylcyclohexadionen gemäß Formel I behandelt werden,

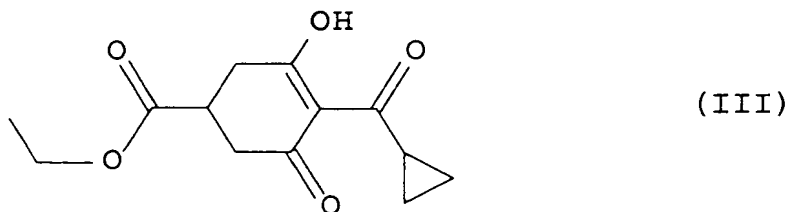


wobei R insbesondere für Wasserstoff, eine C₁-C₆-Alkyl-,
20 C₁-C₆-Haloalkyl-, C₂-C₁₀-Alkylthioalkyl- oder Phenylgruppe (substituiert oder unsubstituiert) und R' für Wasserstoff, eine C₁-C₆-Alkyl-, C₃-C₆-Cycloalkyl-, Benzyl- (substituiert oder unsubstituiert), Phenylethyl-, Phenoxyethyl-, 2-Thienylmethyl-, Alkoxymethyl- oder Alkylthiomethylgruppe steht sowie geeignete
25 Salze dieser Verbindungen.

Bevorzugt ist ein Verfahren bei dem Prohexadion oder seine landwirtschaftlich verwendbaren Salze, insbesondere das Calciumsalz (II),



oder ein Verfahren bei dem Trinexapac-ethyl (III) eingesetzt wird.



2

Bei den Kulturpflanzen handelt es sich um Obstgehölze aus der Familie der Rosaceen wie Apfel und Birne, Pflaume, Zwetschge, Pfirsich, Nektarine und Kirsche sowie um Weinreben.

- 5 Durch das Verfahren wird die Widerstandskraft gegen *Venturia inaequalis* in Apfel und Birne gegen *Botrytis cinerea* bei Weinreben und gegen phytopathogene Pilze in Getreide und Erdnuß erhöht.

- Die Produktivität von Kulturpflanzen kann in vielfältiger Weise
10 durch Streßfaktoren reduziert werden. Zu nennen sind hier unter anderem: Virenerkrankungen, bakterielle und pilzliche Pathogene, schädigende Insekten, Nematoden, Schnecken, Wildverbiß, Hitze, Kühle, Kälte, Wassermangel, zu hoher Wassergehalt des Bodens, Bodenversalzung, zu hohe Strahlungsintensität, zu hoher Ozongehalt,
15 Konkurrenz um Licht, Wasser und Nährstoffe durch Begleitflora, unsachgemäße oder nicht optimal auszubringende Herbizidanwendungen (besonders in Obstkulturen), Behandlungen mit Herbiziden, Insektiziden, Fungiziden, Bioregulatoren oder Blattdüngern von zu geringer Selektivität, Blattapplikationen von Pflanzenschutzmit-
20 teln oder Düngern während intensiver Sonneneinstrahlung.

- Eine Reihe dieser durch Stressoren hervorgerufenen Probleme kann durch den Einsatz von Pflanzenschutzmitteln, durch die Verwendung resistenten Pflanzenmaterials oder geeigneter Anbautechniken mi-
25 nimiert werden. Der Umfang dieser Möglichkeiten ist jedoch begrenzt. Weiterhin zeigen z.B. phytopathogene Pilze häufig eine Anpassung an Fungizide, so daß deren Wirksamkeit nachläßt. Eine ähnliche Anpassung besteht auch bei zunächst "pathogenresistenten" Züchtungen.

- 30 Eine neuartige Methode zur Verbesserung der pflanzlichen Produktivität besteht darin, daß man die natürlichen Abwehrreaktionen einer Pflanze vor dem Einsetzen eines Pilzbefalls durch geeignete exogene Signale auslöst, um so die Auswirkungen des Stresses zu
35 minimieren. Bekannt sind z.B. folgende Mittel: "Bion" (Wirkstoff: Acibenzolar-S-methyl = Benzothiadiazole) zur Induktion der Resistenz gegen Mehltau bei Getreide und "Oryzemat" (Wirkstoff: Probenazol) zur Induktion der Resistenz gegen *Pyricularia oryzae* in Reis , Annu. Rev. Phytopath. 35: 349 - 72 (1997).

- 40 Ein Bedarf an resistenzinduzierenden Mitteln besteht auch bei Dauerkulturen wie Obst und Wein, zumal hier die Einführung resistenter Sorten sehr aufwendig und langwierig ist.

- 45 In der Literatur sind verschiedene Verfahren zur Induktion von Resistenz gegen biotische und abiotische Stressoren bei Obstgehölzen beschrieben. Keines dieser Verfahren zeigt jedoch eine

ausreichende Wirkungssicherheit bzw. die zugehörigen Verfahren sind zu kompliziert oder zu teuer für einen praktischen Einsatz.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es ein einfaches und kostengünstiges Verfahren zur Erhöhung der Widerstandskraft gegen den Befall phytopathogener Pilze bei Kulturpflanzen bereitzustellen.

Die Acylcyclohexandione der Formel I wurden nunmehr überraschend als Induktoren für Resistenz gegen phytopathogene Pilze gefunden. Strukturen derartiger Verbindungen sind beschrieben in den US-Patenten 4,560,403 und 4,693,745.

Bekannt ist, daß diese Substanzen eine Wirkung gegen den bakteriellen Erreger des Feuerbrands ausüben, Jones, A.L., New York Fruit Quarterly 7(1), 19 - 21 (1999). Feuerbrand wird durch das Bakterium *Erwinia amylovora* ausgelöst und richtet insbesondere bei Birne, Apfel und Quitte Schäden an. Eine direkte oder indirekte Wirkung auf Schadpilze durch derartige Verbindungen ist jedoch nicht beschrieben. Durch Behandlung mit Trinexapac-ethyl läßt sich der Befall von Wiesenrispengras (*Poa pratensis*) mit *Leptosphaeria korrae* oder *Drechslera poae* oder der Befall von Rohrschwengel (*Festuca arundinacea*) mit *Rhizoctonia solani* nicht reduzieren (Sanders und Soika, 1992, Fungicide and Nematocide Tests 47:301, 47:300 und 47:309). In den beiden letztgenannten Publikationen wird sogar berichtet, daß durch Trinexapac-ethyl bei einer gleichzeitigen Ausbringung mit dem Fungizid "Banner" (Wirkstoff: Propiconazol) die pilzbekämpfende Wirkung des Fungizids verringert ist.

In einigen Publikationen wird erwähnt, daß durch Prohexadion-Ca der Befall von Obstgehölzen mit Pilzkrankheiten reduziert werden kann. Dabei handelt es sich jedoch um theoretische Überlegungen, die von einem verbesserten Mikroklima in der Baumkrone (ausgelöst durch die wachstumsregulatorische Wirkungen auf die Morphologie der Baumkrone) ausgehen. Belege für eine tatsächliche Reduzierung eines Befalls mit pilzlichen Pathogenen werden nicht erbracht. [Evans, R.R., Evans, J.R. und Rademacher, W. (1997): Prohexadione calcium for suppression of vegetative growth in eastern apples, Acta Horticulturae 451, 663-666; Winkler, V.W. (1997): Reduced risk concept for prohexadione-calcium, a vegetative growth control plant growth regulator in apples, Acta Horticulturae 451, 667-671; Deckers, T. und Daemen, E. (1998): Growth regulation in IFP production systems, Vortrag auf der 4th International Conference on Integrated Fruit Production, Leuven, Belgien, Juli 1998]

4

An einigen Stellen wird erwähnt, daß Acylcyclohexandione wie Prohexadion-Ca oder Trinexapac-ethyl zu einem Schutz von Kulturpflanzen gegen biotische und abiotische Stressoren führt (EP 0 126 713).

5

Prohexadion-Ca, Trinexapac-ethyl und weitere strukturell ähnliche Acylcyclohexandione sind als Wachstumsretardantien, einer bestimmten Gruppe von Bioregulatoren, bekannt. Die genannten Verbindungen unterbinden die Biosynthese von Gibberellinen. Bestimmte Gibberelline bewirken unter anderem eine Streckung der pflanzlichen Zellen, beeinflussen somit in erheblichem Maße das pflanzliche Längenwachstum. Eine Behandlung mit Prohexadion-Ca oder Trinexapac-ethyl führt demgemäß zu gedrungeneren Pflanzen, was von praktischer Bedeutung sein kann (z.B. Reduktion der Lagerneigung bei Getreide, Verlängerung des Mähintervalls bei Rasengräsern).

Andere Typen von Wachstumsretardantien sind verschiedentlich auf ihre Fähigkeit hin untersucht worden, ob sie bei Kulturpflanzen eine Resistenz gegen biotischen oder abiotischen Streß induzieren können. Bekannt ist, daß Triazolyle, wie Paclobutrazol und Uniconazole aufgrund ihrer strukturellen Nähe zu bestimmten Fungiziden eine gewisse pilzabtötende Wirkung aufweisen [vergl. Rademacher, 1991, pp. 169-200, in: Plant Biochemical Regulators, H.W. Gausman (ed.), Marcel Dekker, Inc., New York]. Eine induzierte Resistenz gegen Pilzbefall liegt hier demgemäß nicht vor. Aus der Literatur ist ebenfalls nicht ersichtlich, daß ein durch Wachstumsretardantien hervorgerufener kompakterer Wuchs generell zu einer Resistenz gegen Befall mit pilzlichen Pathogenen führt.

30

Durch die Behandlung der Pflanzen mit Acylcyclohexadionen, Prohexadion-Ca oder Trinexapac-ethyl können die Flavonoide Eriodictyol, Proanthocyanidine, die am C-Atom 3 mit Wasserstoff substituiert sind, z.B. Luteoforol, Luteoliflavan, Apigeniflavan und Tricetiflavan, sowie homogene und heterogene Oligomere und Polymere aus den genannten und strukturell verwandten Substanzen vermehrt gebildet werden.

Erhöhte Konzentrationen der Phenole Hydroxyzimtsäuren (p-Cumarsäure, Ferulasäure, Sinapinsäure), Salicylsäure oder Umbelliferon, einschließlich der aus ihnen gebildeten homogenen und heterogenen Oligomere und Polymere können nach Applikation der Verbindungen Acylcyclohexadionen, Prohexadion-Ca oder Trinexapac-ethyl auf Pflanzen festgestellt werden.

45

5

Die Behandlung mit Verbindungen aus der Gruppe der Acylcyclohexadione der Formel I, Prohexadion-Ca oder Trinexapac-ethyl führt zur Erhöhung der Widerstandskraft gegen phytopathogene Pilze bei Obstgehölzen aus der Familie der Rosaceen wie Apfel und Birne, 5 Pflaume, Zwetschge, Pfirsich, Nektarine und Kirsche sowie bei Weinreben, gegen *Venturia inaequalis* in Apfel und Birne und gegen phytopathogene Pilze in Getreide und Erdnuß.

Allgemein wird durch die Behandlung der Kulturpflanzen mit 10 Verbindungen aus der Gruppe der Acylcyclohexadione, Prohexadion-Ca oder Trinexapac-ethyl die Widerstandskraft gegen folgende phytopathogene Pilze erhöht.

Insbesondere eignet sich das erfindungsgemäße Verfahren zur Erhö- 15 hung der Widerstandskraft bei Befall mit folgenden pflanzenpathogenen Pilzen:

Erysiphe graminis (echter Mehltau) an Getreide
Erysiphe cichoracearum und *Sphaerotheca fuliginea* an Kürbisge- 20 wächsen
Podosphaera leucotricha an Äpfeln,
Uncinula necator an Reben,
Puccinia-Arten an Getreide,
Rhizoctonia-Arten an Baumwolle, Reis und Rasen,
25 *Ustilago*-Arten an Getreide und Zuckerrohr,
Venturia -Arten (Schorf) an Äpfeln und Birnen
Helminthosporium-Arten an Getreide,
Septoria-Arten an Weizen
Botrytis cinerea (Grauschimmel) an Erdbeeren, Gemüse, Zierpflan- 30 zen und Reben,
Cercospora arachidicola an Erdnüssen,
Pseudocercospora herpotrichoides an Weizen und Gerste,
Pyricularia oryzae an Reis,
Phytophthora infestans an Kartoffeln und Tomaten,
35 *Plasmopara viticola* an Reben,
Pseudoperonospora-Arten in Hopfen und Gurken,
Alternaria-Arten an Gemüse und Obst,
Mycosphaerella-Arten in Bananen und Erdnüssen sowie
Fusarium- und *Verticillium*-Arten in Getreide, Gemüse und Zier- 40 pflanzen.

Die Aufwandsmengen bei der Behandlung von Kulturpflanzen mit Verbindungen aus der Gruppe der Acylcyclohexadione, Prohexadion-Ca oder Trinexapac-ethyl zur Erhöhung der Widerstandskraft gegen 45 den Befall mit phytopathogenen Pilzen liegt zwischen 1 und

2.000 g/ha, bevorzugt zwischen 5 und 800 g/ha an aktiver Substanz.

Die folgenden Beispiele belegen die erfindungsgemäße Wirkung von 5 Acylcyclohexadionen wie Prohexadion-Ca und Trinexapac-ethyl auf die Induktion von Resistenz gegen Pilzbefall bei Kulturpflanzen.

Beispiel 1

10 Unwirksamkeit von Prohexadion-Ca als Fungizid

Die pilzlichen Organismen *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger* und *Penicillium funiculosum* wurden auf Nährmedien kultiviert, denen 50, 100, 250, 500 oder 1000 ppm an Prohexadion-Ca zugesetzt 15 waren. - Gegenüber der Kontrolle ohne Wirkstoffzusatz konnte keinerlei Hemmwirkung auf das Pilzwachstum festgestellt werden. Diese Resultate belegen, daß von Prohexadion-Ca keine unmittelbare pilzabtötende Wirkung ausgeht. Ähnliche Befunde sind auch von strukturell verwandten Verbindungen anzunehmen.

20

Beispiel 2

Induktion von Resistenz gegen Befall mit Schorf (*Venturia inaequalis*) bei Apfel (Gewächshausversuch)

25

Apfelsämlinge wurden unter Gewächshausbedingungen bis zum 5-Blatt-Stadium gezogen, um dann mit wäßrigen Aufbereitungen von Prohexadion-Ca, enthaltend 50, 100 oder 200 ppm an Aktivsubstanz, bis tropfnaß behandelt zu werden. Nach 1, 7, 14 und 21 Tagen 30 (TNB) wurden die jüngsten voll ausgebildeten Blätter mit einer Sporensuspension ($5,2$ bis $5,8 \times 10^5$ Konidien pro Milliliter) von *Venturia inaequalis* bis tropfnaß inokuliert. Die Auswertung des Befalls erfolgte 13 oder 20 Tage später (TNI). - Die erzielten Resultate sind der Tabelle 1 zu entnehmen.

35

Tabelle 1

Behandlung	Auswertung	Befall [% der Blattfläche]			
		Tag der Inokulation mit <i>Venturia inaequalis</i>			
		1 TNB	7 TNB	14 TNB	21 TNB
Kontrolle	13 TNI	88	86	84	98
	20 TNI	nb	96	100	nb

45

5	50 ppm	13 TNI	80	84	90	90
		20 TNI	nb	88	94	nb
	100 ppm	13 TNI	90	70	80	90
		20 TNI	nb	70	82	nb
	200 ppm	13 TNI	88	64	74	58
		20 TNI	nb	64	66	nb

nb = nicht bestimmt

10

Beispiel 3

Induktion von Resistenz gegen Befall mit Schorf (*Venturia inaequalis*) bei Apfel (Gewächshausversuch)

15

Apfelsämlinge wurden unter Gewächshausbedingungen bis zum 5-Blatt-Stadium gezogen, um dann mit einer wäßrigen Aufbereitung von Prohexadion-Ca, enthaltend 100 ppm an Aktivsubstanz, bis tropfnaß behandelt zu werden. Nach 7, 10, 14, 21 und 7+21 (Doppelbehandlung) Tagen (TNB) wurden die jüngsten voll ausgebildeten Blätter mit einer Konidiensuspension (ca. $1,5 \times 10^5$ Sporen pro Milliliter) von *Venturia inaequalis* inokuliert. "Discus", BASF AG, Ludwigshafen (Wirkstoff: Kresoxim-methyl) wurde mit 100 ppm an aktiver Substanz als Vergleichsmittel einen Tag vor der Inokulation eingesetzt. Die Auswertung des erfolgten Pilzbefalls erfolgte 17 und 24 Tage später (TNI). - Die erzielten Resultate sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

25

Tabelle 2

30

35	Behandlung	Auswertung	Befall [% der Blattfläche]					
			Tag der Inokulation (TNB) mit <i>Venturia inaequalis</i>					
			1	7	10	14	21	7+21
40	Kontrolle	17 TNI	52,5	—	—	—	—	—
		24 TNI	60,0	—	—	—	—	—
	Prohexadion-Ca 100 ppm	17 TNI	nb	12,5	32,5	15,0	28,8	20,0
		24 TNI	nb	15,0	41,3	18,8	38,8	23,8
45	Kresoxim-methyl 100 ppm	17 TNI	0,0	—	—	—	—	—
		24 TNI	0,0	—	—	—	—	—

nb = nicht bestimmt

8

- = nicht bestimmt (zu erwarten sind Befallsgrade ähnlich 1 TNB)

-- = nicht bestimmt (zu erwarten ist eine Befallszunahme bei zunehmender Zeitdistanz zwischen Fungizidbehandlung und Inokulation)

Beispiel 4

Induktion von Resistenz gegen Befall mit Schorf (*Venturia inaequalis*) bei Apfel

(Vegetationshallenversuch)

Apfelsämlinge wurden unter Gewächshausbedingungen bis zum 5-Blatt-Stadium gezogen und anschließend unter freilandartigen Bedingungen (Vegetationshalle) für eine Woche weiterkultiviert. Anschließend wurden die Pflanzen mit wäßrigen Aufbereitungen von Prohexadion-Ca, enthaltend 50, 100 oder 200 ppm an Aktivsubstanz, bis tropfnaß behandelt. Nach 6, 13, 19, 26 und 34 Tagen (TNB) wurden die jüngsten voll ausgebildeten Blätter mit einer Konidien suspension ($5,2$ bis $5,8 \times 10^5$ Sporen pro Milliliter) von *Venturia inaequalis* bis tropfnaß inokuliert. Die Auswertung des Befalls erfolgte 13 oder 20 Tage später (TNI). - Die erzielten Resultate sind der Tabelle 3 zu entnehmen.

25

30

35

40

45

Tabelle 3

5	Behandlung	Auswertung	Befall [% der Blattfläche]				
			Tag der Inokulation mit <i>Venturia inaequalis</i>				
			6 TNB	13 TNB	19 TNB	26 TNB	34 TNB
10	Kontrolle	13 TNI	92	94	88	96	78
		20 TNI	98	100	96	96	96
	50 ppm	13 TNI	78	32	44	65	78
		20 TNI	90	46	74	55	98
15	100 ppm	13 TNI	78	4	15	0	38
		20 TNI	86	1	28	0	70
	200 ppm	13 TNI	68	0	0	35	80
		20 TNI	78	0	1	38	98

20 Beispiel 5

Reduktion des Schorfbefalls bei Apfel durch Vorbehandlung mit Prohexadion-Ca

25 (Freilandversuch)

Unter den Wachstumsbedingungen der Königlichen Versuchsanstalt Gorse (Sint-Truiden, Belgien) wurden im Jahre 1998 Versuche zum Schorfbefall bei den Sorten "Golden Delicious" und "Jonagold" durchgeführt. Dabei wurde Prohexadion-Ca in ein Behandlungsprogramm zur Schorfbekämpfung integriert und zu den Entwicklungsstadien 55-56, 61 und 71 mit jeweils 100 g/ha an aktiver Substanz appliziert. - Bei den unbehandelten Pflanzen war ein erheblicher Befall mit Schorf an Blättern und Früchten zu verzeichnen. Bei den Pflanzen, die unter anderem mit Prohexadion-Ca behandelt waren, konnte dagegen kein oder nur ein stark reduzierter Befall festgestellt werden. Anhand der hier insgesamt eingesetzten Wirkstoffe und der dabei jeweils gewählten Applikationstermine ist davon auszugehen, daß der erzielte Effekt zu einem wesentlichen Teil auf die Verwendung von Prohexadion-Ca zurückzuführen ist. Die Schorfwirkung war dabei nahezu vergleichbar mit dem Effekt des Standardfungizids "Scala" (Wirkstoff: Pyrimethanil), welches zu den Entwicklungsstadien 54, 55, 56, 61, 65, 71, 72 und 73 mit jeweils 450 g/ha an aktiver Substanz ausgebracht worden war.

Den Tabellen 2 bis 4 ist zu entnehmen, daß der Befall von Apfelpflanzen mit Apfelschorf durch eine Vorbehandlung mit Prohexadion-Ca deutlich vermindert werden kann. Dies wird insbesondere bei den unter freilandartigen Bedingungen kultivierten Pflanzen (Tabelle 2 und Beispiel 4) deutlich. Es zeigt sich auch, daß nach der Applikation von Prohexadion-Ca ein Zeitraum von mehreren Tagen erforderlich ist, bevor es zu einer Befallsreduktion kommt. Dies weist darauf hin, daß der Wirkstoff selbst keinerlei fungizide Wirkung besitzt (wie auch aus dem Beispiel 1 hervorgeht), sondern daß er vielmehr eine Abwehrreaktion in der Pflanze auslöst, die zu einem erhöhten Widerstand gegen Schorfbefall führt.

Beispiel 6

Induktion von Resistenz gegen Befall mit *Botrytis cinerea* bei roten Tafeltrauben

(Sorte: "Catawba")

Tafeltrauben der Sorte "Catawba" wurden in der Saison 1996/97 unter den Wachstumsbedingungen der BASF-Versuchsstation Nelspruit in der Republik Südafrika kultiviert. Zum Entwicklungsstadium 75 (Beeren ca. erbsengroß) sowie 14 Tage später wurden die Fruchtstände jeweils zweimal mit 500 oder 1000 ppm an Aktivsubstanz von Prohexadion-Ca bis tropfnaß besprüht. Nach Ernte der ausgereiften Trauben wurden einzelne Beeren durch einen Nadelstich verletzt und anschließend kurz in eine Sporensuspension von *Botrytis cinerea* gelegt. Danach wurden die Beeren für ca. 7 Tage bei 23°C inkubiert. Anschließend wurde der Befallsgrad der Beeren mit *Botrytis cinerea* bestimmt: Während die unbehandelten Beeren einen sehr starken Befall aufwiesen, führte eine Vorbehandlung mit zweimal 500 ppm an Prohexadion-Ca zu einer deutlich reduzierten Infektion. Eine zweimalige Applikation von 1000 ppm an Prohexadion-Ca bewirkte eine nahezu vollständige Infektionsverhinderung.

Aus Beispiel 6 geht hervor, daß durch Prohexadion-Ca auch bei der mit Apfel nicht verwandten Pflanzenart Wein eine reduzierte Anfälligkeit gegen ein pilzliches Pathogen hervorgerufen werden kann.

Beispiel 7

Induktion von Resistenz gegen Befall mit *Botrytis cinerea* bei roten Weintrauben

(Sorte: "Dornfelder")

11

"Dornfelder"-Trauben wurden in der Saison 1998 unter den Anbaubedingungen der Pfalz kultiviert. Die Behandlung der Trauben erfolgte analog zum Beispiel 6. Auch die Resultate nach Infektion mit Sporen von *Botrytis cinerea* waren praktisch deckungsgleich mit denen aus dem Beispiel 6.

Aus Beispiel 7 geht ebenfalls hervor, daß durch Prohexadion-Ca auch bei der mit Apfel nicht verwandten Pflanzenart Wein eine reduzierte Anfälligkeit gegen ein pilzliches Pathogen hervorgerufen werden kann.

15

20

25

30

35

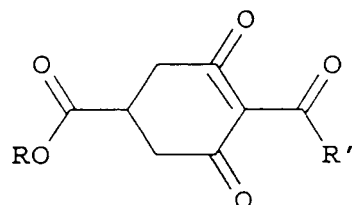
40

45

Verfahren zur Erhöhung der Widerstandskraft von Kulturpflanzen
gegen phytopathogene Pilze

5 Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Erhöhung der Wider-
standskraft von Kulturpflanzen gegen phytopathogene Pilze, da-
durch gekennzeichnet, daß die Kulturpflanzen mit wachstumsregu-
lierenden Acylcyclohexadionen gemäß Formel I behandelt werden.



(I)



1
2
3

FOUR 00/05272
BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



09/980266

10. JULI 2000

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 199 26 154.7

Anmeldetag: 9. Juni 1999

Anmelder/Inhaber: KTB Tumorforschungs GmbH, Freiburg/DE

Bezeichnung: Verfahren zur Herstellung einer injizierbaren Arzneimittelzubereitung

IPC: A 61 K 31/71

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 17. Juli 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Frank

Faust

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17 (a) OR (b)

PATENTANWÄLTE

European Patent Attorneys
European Trade Mark Attorneys

DIPL.-ING. **H. WEICKMANN**
DIPL.-ING. **F. A. WEICKMANN**

DIPL.-CHEM. **B. HUBER**

DR.-ING. **H. LISKA**

DIPL.-PHYS. DR. **J. PRECHTEL**

DIPL.-CHEM. DR. **B. BÖHM**

DIPL.-CHEM. DR. **W. WEISS**

DIPL.-PHYS. DR. **J. TIESMEYER**

DIPL.-PHYS. DR. **M. HERZOG**

DIPL.-PHYS. **B. RUTTENSBERGER**

POSTFACH 860 820
81635 MÜNCHEN

KOPERNIKUSSTRASSE 9
81679 MÜNCHEN

TELEFON (089) 45563 0

TELEX 522 621

TELEFAX (089) 45563 999

E-MAIL email@weickmann.de

23. Mai 2000

Unser Zeichen:
20151P DE/HBwr

Anmelder:
KTB Tumorforschungs GmbH
Breisacher Straße 17

DE 79106 Freiburg

Verfahren zur Herstellung einer injizierbaren Arzneimittelzubereitung

Verfahren zur Herstellung einer injizierbaren Arzneimittelzubereitung

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung injizierbarer Arzneimittelzubereitungen, enthaltend eine pharmakologisch aktive Substanz, die aus einem Wirkstoff, einem Spacermolekül und wenigstens einem proteinbindenden Molekül besteht und nach dem Zusammenbringen mit dem Körper über das proteinbindende Molekül kovalent an Körperflüssigkeits- oder Gewebebestandteile bindet, so daß eine Transportform des Wirkstoffs vorliegt, der pH-abhängig oder enzymatisch im Körper unter Freisetzung des Wirkstoffs spaltbar ist.

10

15

Der Großteil der zur Zeit eingesetzten Pharmaka sind niedermolekulare Verbindungen und weisen nach systemischer Applikation eine hohe Plasma- sowie Gesamtclearance auf. Des weiteren dringen sie aufgrund von Diffusionsvorgängen in die Gewebestrukturen des Körpers ein und weisen in der Regel eine gleichmäßige Bioverteilung auf. Beide Eigenschaften führen dazu, daß nur geringe Mengen des Pharmakons den Wirkort erreichen und das Pharmakon aufgrund seiner Verteilung auf das gesunde Gewebe des Körpers Nebenwirkungen hervorruft. Diese Nachteile sind besonders bei solchen Pharmaka ausgeprägt, die ein hohes zytotoxisches Potential besitzen, wie etwa Zytostatika, Immunsuppressiva oder Virostatika.

20

25

30

Um die Selektivität von niedermolekularen Pharmaka zu verbessern, werden mehrere Strategien verfolgt, beispielsweise die chemische Derivatisierung von Leitstrukturen, die Formulierung als Prodrugs oder die Kopplung der Pharmaka an Trägermoleküle. Die vorliegende Erfindung geht von solchen Konzepten aus, bei denen Pharmaka an körpereigene Makromoleküle chemisch gebunden wurden. Bekannt sind Konjugate, bei denen im allgemeinen Zytostatika an Serumproteine, vorwiegend an bestimmte

Trägersmoleküle wie Humanserumalbumin und Humanserumtransferin, gebunden werden und dann verabreicht werden. Diese bekannten Proteinkonjugate werden dadurch hergestellt, daß man ex vivo entweder in einem "Eintopfverfahren" das Zytostatikum an das Serumprotein koppelt (DE 41 22 210 A1) und das resultierende Albumin-Zytostatikum-Konjugat 5 gewinnt oder daß man zunächst das Zytostatikum mit einem geeigneten Spacermolekül derivatisiert, das resultierende Produkt isoliert und in einem zweiten Schritt das so derivatisierte Zytostatikum über eine Maleinimidgruppe an das Protein koppelt (DE 196 36 889 A1 und PCT/DE 97/02000) und das resultierende Albumin-Zytostatikum-Konjugat isoliert. 10 Beide Verfahren haben den Nachteil, daß Plasmaproteine verwendet werden, die pathogene Erreger enthalten können. Weitere Nachteile der beschriebenen Protein-Wirkstoff-Konjugate sind ihre unbefriedigende Stabilität und Lagerbeständigkeit und der technische Aufwand ihrer Herstellung. 15

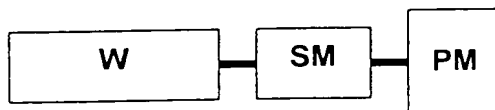
Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, diese Nachteile zu überwinden. Gelöst wird diese Aufgabe durch ein Verfahren zur Herstellung einer injizierbaren Arzneimittelzubereitung, enthaltend eine pharmakologisch 20 aktive Substanz, die in einer injizierbaren Trägerflüssigkeit gelöst wird, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß als pharmakologisch aktive Substanz eine Verbindung bestehend aus einem Wirkstoff, und wenigstens einem proteinbindenden Molekülrest, die durch einen Spacer verbunden sind verwendet wird, worin der Spacer oder die Bindung zwischen dem Wirkstoff 25 und dem Spacer pH-abhängig oder enzymatisch im Körper spaltbar sind unter Freisetzung des Wirkstoffs.

Die Erfindung beruht auf der überraschenden Feststellung, daß es nicht, wie bisher angenommen wurde, nötig ist, einen Wirkstoff mit einem bestimmten 30 Träger unter definierten Bedingungen zu verbinden und das Produkt zu verabreichen sondern daß es möglich ist, pharmakologisch aktive Substanzen, bestehend aus einem pharmakologischen Wirkstoff, und

wenigstens einem proteinbindenden Molekülteil, die durch einen Spacer miteinander verbunden sind, direkt als injizierbare Arzneimittel einzusetzen, da diese nach dem Zusammenbringen mit dem Körper über das proteinbindende Molekül kovalent derart an Körperflüssigkeits- oder Gewebebestandteile, vorwiegend an Serumproteine, binden, daß in vivo eine Transportform des Wirkstoffs gebildet wird, welche die Zielzellen bzw. das Zielgewebe des Wirkstoffs erreicht. Da erfindungsgemäß bei der pharmakologisch aktiven Substanz die Bindung im Spacermolekül oder zwischen dem Wirkstoff und dem Spacermolekül pH-abhängig oder enzymatisch im Körper spaltbar ist, wird der Wirkstoff trotzdem gezielt am gewünschten Zielort freigesetzt.

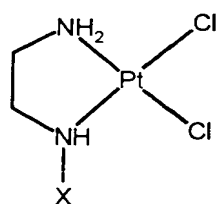
Erfindungsgemäß erhaltene injizierbare Arzneimittelzubereitungen von pharmakologisch aktiven Substanzen verändern und verbessern aufgrund ihrer proteinbindenden Eigenschaften das pharmakokinetische Profil der Wirkstoffe entscheidend. Wenn diese pharmakologisch aktiven Substanzen in Körperflüssigkeiten gelangen, binden sie kovalent an Körperflüssigkeits- oder Gewebebestandteile, vorzugsweise an Serumproteine, mehr bevorzugt an Serumalbumin, um so als makromolekulare Prodrugs vorzuliegen, die den Wirkstoff zu dem Zielort transportieren und/oder ihn in einer dosierten Form freisetzen.

Die erfindungsgemäß erhaltene pharmakologisch aktive Substanz besteht aus einem Wirkstoff W, einem Spacermolekül SM und wenigstens einem proteinbindenden Molekül PM mit folgender allgemeinen Struktur:

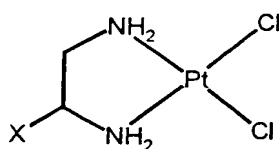


Der Wirkstoff ist ein Zytostatikum, ein Zytokin, ein Immunsuppressivum, ein Virostatikum, ein Antirheumatikum, ein Analgetikum, ein Antibiotikum oder ein Antimykotikum.

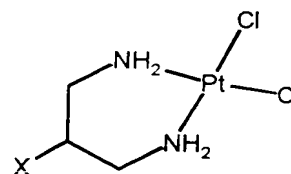
Bevorzugte Zytostatika für die Herstellung von injizierbaren pharmakologisch aktiven Substanzen gemäß der vorliegenden Erfindung sind die Anthrazykline Doxorubicin, Daunorubicin, Epirubicin, Idarubicin, Mitoxantron und Ametantron sowie verwandte Derivate, die Alkylantien Chlorambucil, Bendamustin, Melphalan und Oxazaphosphorine sowie verwandte Derivate, die Antimetabolite Methotrexat, 5-Fluorouracil, 5'-Desoxy-5-fluorouridin und Thioguanin sowie verwandte Derivate, die Taxane Paclitaxel und Docetaxel sowie verwandte Derivate, die Camptothecine Topotecan, Irinotecan, 9-Aminocamptothecin und Camptothecin sowie verwandte Derivate, die Podophyllotoxinderivate Etoposid, Teniposid und Mitoposid sowie verwandte Derivate, die Vinca-Alkaloide Vinblastin, Vincristin, Vindesin und Vinorelbin sowie verwandte Derivate und eine Verbindung der allgemeinen Formel I bis XII:



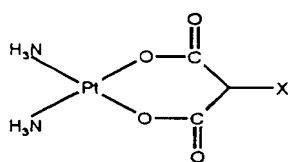
Formel I



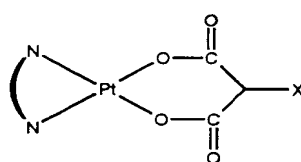
Formel II



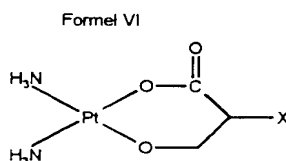
Formel III



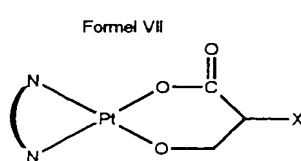
Formel IV



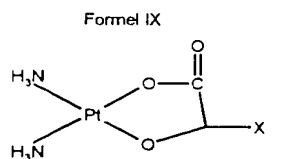
Formel V



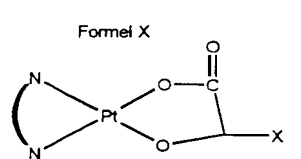
Formel VI



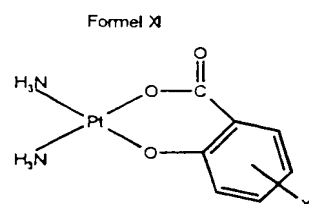
Formel VII



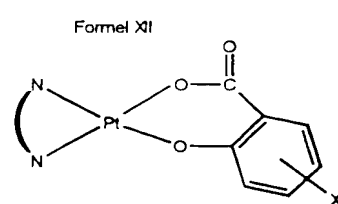
Formel IX



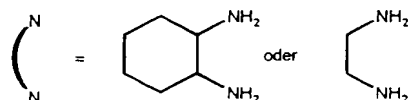
Formel X



Formel XI



Formel XII



wobei X das Spacermolekül SM oder das proteinbindende Molekül PM bedeutet.

5 Bevorzugte Zytokine für die Herstellung von pharmakologisch aktiven Substanzen der vorliegenden Erfindung sind Interleukin 2, Interferon α -2a, Interferon α -2b, Interferon β -1a, Interferon β -1b, Interferon γ -1b und verwandte Derivate. Die verwendeten Zytokine sind i.d.R. gentechnisch hergestellte Arzneimittel.

10 Bevorzugte Immunsuppressiva für das Verfahren der vorliegenden Erfindung sind Cyclosporin A und verwandte Derivate.

Besonders geeignete Antirheumatika für das Verfahren der vorliegenden Erfindung sind Methotrexat und verwandte Derivate.

15 Bevorzugte Analgetika für das Verfahren der vorliegenden Erfindung sind Salicylsäurederivate, wie etwa Acetylsalicylsäure und verwandte Derivate, Pharmaka-Derivate, die eine Essig- oder Propionsäuregruppe aufweisen, wie etwa Diclofenac bzw. Indometacin oder Ibuprofen bzw. Naproxen, und
20 Aminophenolderivate, wie etwa Paracetamol.

Bevorzugte Antimykotika für Verfahren der vorliegenden Erfindung sind Amphotericin B und verwandte Derivate.

25 Bevorzugte Virostatika für das Verfahren der vorliegenden Erfindung sind Nukleosidanaloga, wie etwa Aciclovir, Ganciclovir, Idoxuridin, Ribavirin, Vidaribin, Zidovudin, Didanosin und 2',3'-Didesoxycytidin (ddC) und verwandte Derivate, und Amantadin.

30 Bevorzugte Antibiotika für das Verfahren der vorliegenden Erfindung sind Sulfonamide, wie etwa Sulanilamid, Sulfacarbamid und Sulfametoxydiazin und verwandte Derivate, Penicilline, wie etwa 6-Aminopenicillansäure,

Penicillin G sowie Penicillin V und verwandte Derivate, Isoxazolpenicilline (z.B. Oxacillin, Cloxacillin, Flucloxacillin) und verwandte Derivate, α -substituierte Benzylpenicilline (z.B. Ampicillin, Carbenicillin, Pivampicillin, Amoxicillin) und verwandte Derivate, Acylaminopenicilline (z.B. Mezlocillin, Azlocillin, Piperacillin, Apalocillin) und verwandte Derivate, Amidinopenicilline, wie etwa Mecillinam, atypische β -Lactame, wie etwa Imipenam und Aztreonam, Cephalosporine, wie etwa Cefalexin, Cefradin, Cefaclor, Cefadroxil, Cefixim, Cefpodoxim, Cefazolin, Cefazedon, Cefuroxim, Cefamandol, Cefotiam, Cefoxitin, Cefotetan, Cefmetazol, Latamoxef, Cefotaxim, Ceftriaxon, Ceftizoxim, Cefmonoxim, Ceftazidim, Cefsulodin und Cefoperazon und verwandte Derivate, Tetracycline, wie Tetracyclin, Chlortetracyclin, Oxytetracyclin, Demeclocyclin, Rolitetracyclin, Doxycyclin und Minocyclin und verwandte Derivate, Chloramphenicole, wie etwa Chloramphenicol und Thiamphenicol und verwandte Derivate, Gyrasehemmstoffe, wie etwa Nalixidinsäure, Pipemidsäure, Norfloxacin, Ofloxacin, Ciprofloxacin und Enoxacin und verwandte Derivate, und Tuberkulosemittel, wie etwa Isoniazid und verwandte Derivate.

Das Spacermolekül SM ist ein organisches Molekül bestehend aus einer aliphatischen Kohlenstoffkette und/oder mindestens einem Aromaten. Die aliphatische Kohlenstoffkette besteht vorzugsweise aus 1-12 Kohlenstoffatomen die teilweise durch Sauerstoffatome ersetzt sein können und kann gegebenenfalls substituiert sein, insbesondere durch eine oder mehrere wasserlösliche Gruppen, wie Sulfonsäure-, Aminoalkyl- oder Hydroxygruppen. Der Aromat ist vorzugsweise ein Benzolring, der gegebenenfalls substituiert sein kann, wie etwa mit den obengenannten wasserlösliche Gruppen. Die aliphatische Kohlenstoffkette kann zur besseren Wasserlöslichkeit Sauerstoffatome enthalten und sich dazu zweckmäßig von einer Oligoethylenoxid- oder -propylenoxidkette ableiten, z.B. eine Diethylenglycol-, Triethylenglycol- oder Dipropylenglycolkette sein.

Das proteinbindende Molekül PM ist vorzugsweise eine Maleinimidgruppe, eine Halogenacetamidgruppe, eine Halogenacetatgruppe, eine Pyridyldithio-Gruppe, eine N-Hydroxysuccinimidester- oder eine Isothiocyanat-Gruppe. Die Maleinimid-, Pyridyldithio- bzw. N-Hydroxysuccinimidester-Gruppe kann
5 gegebenenfalls mit Alkyl oder mit den obengenannten wasserlösliche Gruppen substituiert sein. PM besitzt proteinbindende Eigenschaften, d.h. es bindet im physiologischen Milieu kovalent an bestimmte Aminosäuren auf der Proteinoberfläche. Dabei reagiert die Maleinimid-, die Halogenacetamid-, die Halogenacetat- bzw. die Pyridyldithio-Gruppe vorzugsweise mit HS-
10 Gruppen von Cysteinen, die N-Hydroxysuccinimidester- und Isothiocyanatgruppe reagiert vorzugsweise mit der Aminogruppe von Lysinen auf der Proteinoberfläche.

Die durch das Verfahren der vorliegenden Erfindung als injizierbare
15 Arzneimittelzubereitung bereitgestellte pharmakologisch aktive Substanz gelangt nach parenteraler Applikation in die Blutbahn und kann über PM an Proteine binden. Bevorzugt erfolgt die Bindung an Serumproteine, insbesondere Serumalbumin. Es wurde gefunden, daß im physiologischen Milieu die pharmakologisch aktive Substanz über die Maleinimid-,
20 Halogenacetamid-, Halogenacetat- bzw. Pyridyldithio-Gruppe insbesondere mit dem freien Cystein-34 des Albumins reagiert und auf diesem Weg kovalent gebunden wird. Pharmakologisch aktive Substanzen mit einer N-Hydroxysuccinimidester- bzw. Isothiocyanat-Gruppe binden bevorzugt an die ϵ -Aminogruppe von Lysinen auf der Proteinoberfläche von Albumin oder
25 anderen Serumproteinen. Serumproteine, wie Albumin oder Transferrin, weisen eine ausgesprochen lange Halbwertszeit im systemischen Kreislauf auf (bis zu 19 Tagen - Peters, T. Jr. (1985): Serum albumin. Adv. Protein. Chem. 37, 161-245). Aufgrund einer erhöhten Permeabilität von Gefäßwänden des malignen, infizierten bzw. entzündeten Gewebes für
30 Makromoleküle gelangt Serumalbumin bevorzugt in dieses Zielgewebe (Maeda, H.; Matsumura, Y. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys.* (1989), 6, 193-210). Dadurch kann ein an Albumin gekoppelter Wirkstoff gezielter den

Wirkort erreichen. Des weiteren verhindert die kovalente Kopplung des Wirkstoffs an Serumproteine in der Blutbahn, das der Wirkstoff in gesunde Gewebestrukturen des Körpers diffundiert oder über die Niere eliminiert wird bzw. diese in dem Maße schädigt wie der nicht gebundene Wirkstoff.
5 Dadurch wird das pharmakokinetische Profil des Wirkstoffs verändert und verbessert, da seine Wirkung durch eine Anreicherung am Wirkort erhöht wird und gleichzeitig die toxischen Wirkungen auf gesunde Systeme des Körpers verringert werden.

10 Die gemäß der vorliegenden Erfindung verwendeten pharmakologisch aktiven Substanzen enthalten im Spacermolekül oder zwischen SM und W eine definierte chemische Bindung. Diese Bindung ist pH-abhängig, vorzugsweise säurelabil, oder sie enthält mindestens eine Peptidbindung, die im Körper enzymatisch gespalten wird. Die säurelabilen Bindungen sind
15 Ester-, Acetal-, Ketal-, Imin-, Hydrazon, Carboxylhydrazon- oder Sulfonylhydrazonbindungen. Die Peptidsequenz in den realisierten Peptidbindungen besteht in der Regel aus etwa 2-30 Aminosäuren. Die Peptidsequenz ist dabei vorzugsweise auf die Substratspezifität bestimmter Enzyme, nachstehend als Targetenzyme bezeichnet, im Körper zugeschnitten, so daß die Peptidsequenz oder ein Teil diese Sequenz von
20 einem Enzym im Körper erkannt wird und das Peptid gespalten wird. Die Targetenzyme können sowohl körpereigene Enzyme sein oder Enzyme, die in Mikroorganismen vorkommen bzw. von diesen gebildet werden.

25 Die Targetenzyme sind in der Regel Proteasen und Peptidasen, beispielsweise Matrix-Metalloproteasen (MMP) oder Cysteinproteasen, die bei Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis oder Krebs verstärkt gebildet oder aktiviert sind, was zum exzessiven Gewebeabbau, zu Entzündungen und zur Metastasierung führt. Targetenzyme sind insbesondere MMP 2,
30 MMP3 und MMP 9, die als Proteasen bei den genannten pathologischen Prozessen beteiligt sind (Vassalli, J., Pepper, M.S. (1994), *Nature* 370, 14-15, Brown, P.D. (1995), *Advan Enzyme Regul.* 35, 291-301).

Weitere Proteasen, die Targetenzyme für pharmakologisch aktive Substanzen der vorliegenden Erfindung darstellen, sind Cathepsine, insbesondere Cathepsin B und H, die als Schlüsselenzyme bei entzündlichen und malignen Erkrankungen identifiziert worden sind ().

5

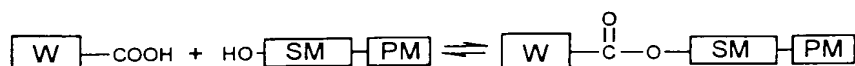
Beide Bindungstypen – säurelabile Bindung bzw. Peptidbindung – gewährleisten, daß der Wirkstoff oder ein entsprechend aktives Derivat am Wirkort extrazellulär und/oder intrazellulär gespalten wird und seine pharmakologische Wirkung entfalten kann.

10

Die im Verfahren der vorliegenden Erfindung verwendete pharmakologisch aktive Substanz kann gemäß einer der untenstehenden allgemeinen Beschreibungen hergestellt werden:

15

Wirkstoffe, die eine HOOC-Gruppe besitzen, werden folgendermaßen derivatisiert:



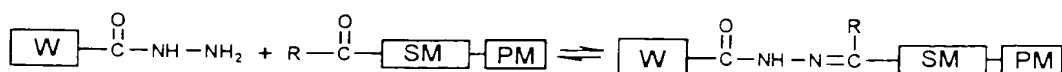
20

Die Veresterung erfolgt dabei durch übliche Verfahren, die dem Fachmann geläufig sind.

25

Es ist weiterhin möglich, die HOOC-Gruppe in eine Hydrazidgruppe zu überführen, z.B. durch Umsetzen mit tert.-Alkylcarbazaten und anschließende Spaltung mit Säuren (beschrieben in DE 196 36 889), und das eine Hydrazidgruppe aufweisende Pharmakon mit einem eine Carbonylkomponente enthaltenen Spacer, bestehend aus PM und SM, umzusetzen, wie u.a. in DE 196 36 889 A1 bzw. PCT/DE 97/02000 beschrieben ist:

30



R = H, Alkyl, Phenyl, substituiertes Phenyl

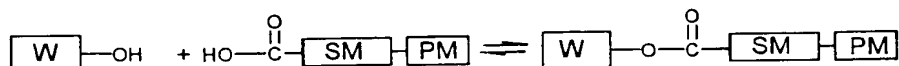
Wirkstoffe der vorliegenden Erfindung, die eine H₂N-Gruppe besitzen, werden folgendermaßen derivatisiert:



R = H, Alkyl, Phenyl, substituiertes Phenyl

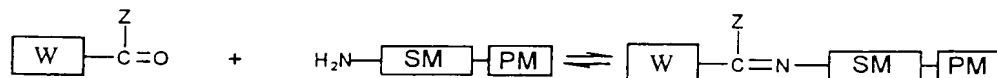
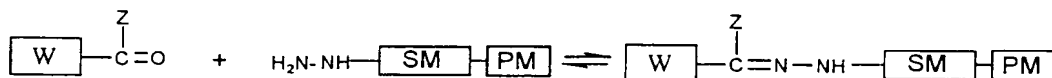
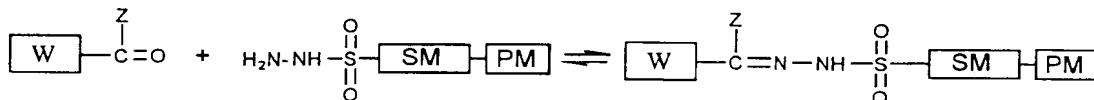
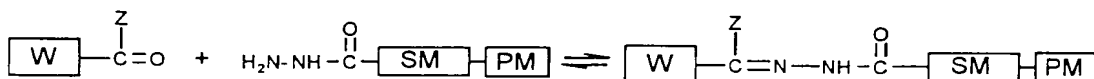
Die Reaktion zu den Iminderivaten erfolgt dabei durch übliche Verfahren, die dem Fachmann geläufig sind.

Wirkstoffe der vorliegenden Erfindung, die eine HO-Gruppe besitzen, werden folgendermaßen derivatisiert:



Die Veresterung erfolgt dabei durch übliche Verfahren, die dem Fachmann geläufig sind.

Wirkstoffe der vorliegenden Erfindung, die eine Carbonylkomponente besitzen, werden folgendermaßen derivatisiert:



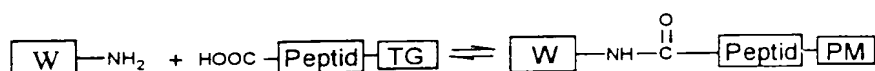
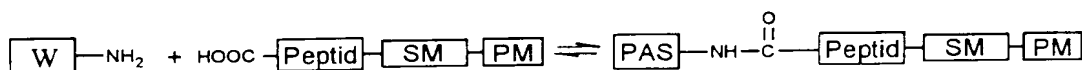
Z = chemische Gruppe des Wirkstoffs

Die Umsetzung zu den Carboxyhydrazon-, Sulfonylhydrazon-, Hydrazon- bzw. Iminderivaten erfolgt dabei gemäß Verfahren, die u.a. in DE 196 36

889 A1 bzw. PCT/DE 97/02000 beschrieben sind, oder durch übliche Verfahren, die dem Fachmann geläufig sind.

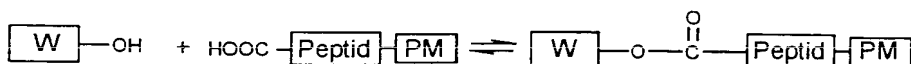
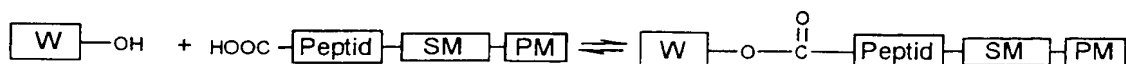
Die Spacer, die aus dem proteinbindenden Molekül PM und dem Spacermolekül SM bestehen, können z.B. gemäß Verfahren, die u.a. in DE 196 36 889 A1, U. Beyer et al. Chemical Monthly, 128, 91, 1997, R.S. Greenfield et al, *Cancer Res.*, 50, 6600, 1990, T. Kaneko et al., *Bioconjugate Chem.*, 2, 133, 1991, Bioconjugate Techniques, G.T. Hermanson, Academic Press, 1996 oder in US-Patent 4,251,445 beschrieben sind, hergestellt werden.

Pharmakologisch aktive Substanzen für die vorliegende Erfindung, die eine Peptidbindung enthalten, können dadurch hergestellt werden, daß ein Peptid, das aus 2 bis etwa 30 Aminosäuren besteht, mit einer proteinbindenden Verbindung umgesetzt wird, so daß ein proteinbindendes Molekül direkt oder über ein Spacermolekül SM am N-terminalen Ende des Peptids eingeführt wird. Die so erhaltenen Peptidderivate können mit einem Wirkstoff, der eine H₂N- oder HO-Gruppe besitzt, in der Gegenwart eines Kondensationsmittels, wie zum Beispiel N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) oder N-Cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)-carbodiimid Metho-p-toluolsulfonat (CMC), und gegebenenfalls unter Zusatz von N-Hydroxysuccinimid oder eines wasserlöslichen N-

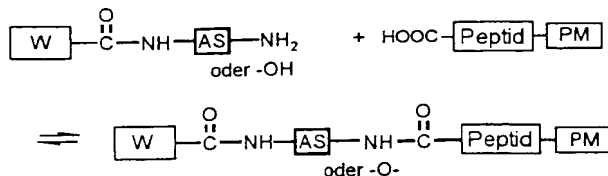
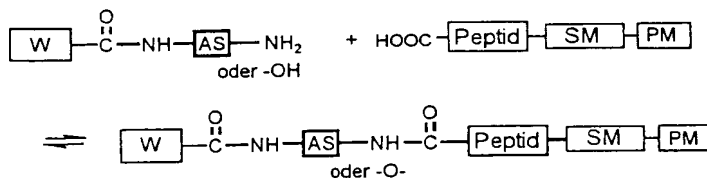
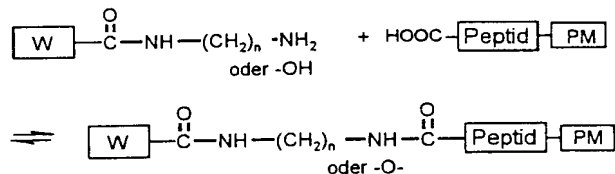
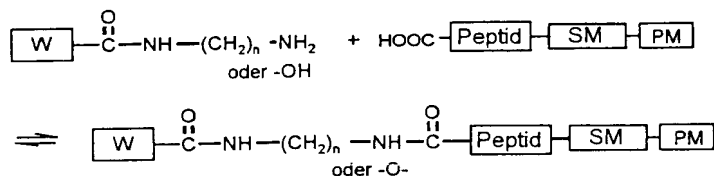


Hydroxysuccinimids, wie etwa N-Hydroxysuccinimid-3-sulfonsäure Natriumsalz, zu den entsprechenden proteinbindenden Wirkstoff-Peptidderivaten umgesetzt werden:

Es ist weiterhin möglich, über die HOOC-Gruppe der Wirkstoffe eine H₂N- oder HO-Gruppe einzuführen, beispielsweise durch Derivatisierung mit den Aminosäuren Lysin, Serin oder Threonin über deren α -Aminogruppe oder über die α -Aminogruppe mit einer Diaminoverbindung der allgemeinen Formel H₂N-(CH₂)_n-NH₂ oder mit einem Alkoholamin der allgemeinen Formel H₂N-(CH₂)_n-OH mit n = 1-12, und diese



Derivate im Anschluß mit den oben genannten Peptidderivaten zu den entsprechenden proteinbindenden Wirkstoff-Peptidderivaten umzusetzen:



AS = Lysin, Serin oder Threonin

Die Substratspezifität von Targetenzymen, wie etwa von MMP 2, MMP3, MMP 9, Cathepsin B und H, ist bekannt (Netzel-Arnett et al. (1993),
5 *Biochemistry* 32, 6427-6432, Shuja, S., Sheahan, K., Murnane, M.J. (1991), *Int.J.Cancer* 49, 341-346, Lah, T.T., Kos, J. (1998), *Biol. Chem.* 379, 125-130).

Beispielsweise sind Octapeptide ($P_4 - P'_4$) für MMP 2 und MMP 9 identifiziert worden, welche die Spaltsequenz der Kollagenkette simulieren,
10 und besonders effizient von MMP 2 und 9 gespalten werden:

Peptid

$P_4 \quad P_3 \quad P_2 \quad P_1 \quad P'_1 \quad P'_2 \quad P'_3 \quad P'_4$

15 Gly-Pro-**Leu**-Gly — Ile-Ala-Gly-Gln

Gly-Pro-Gln-Gly — Ile-**Trp**-Gly-Gln

(Netzel-Arnett et al., *Biochemistry* 32, 1993, 6427-6432).

20 Die Peptide werden ausschließlich an der $P_1 - P'_1$ -Bindung enzymatisch gespalten.

Des weiteren sind bei Cathepsin B substratspezifische Dipeptide bekannt mit der Sequenz -Arg-Arg- oder -Phe-Lys- (Werle, B., Ebert, E., Klein, W., Spiess, E. (1995), *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 376, 157-164; Ulrich, B.,
25 Spiess, E., Schwartz-Albiez, R., Ebert, W. (1995), *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 376, 404-414).

Die Peptidsequenz, welche die für das Targetenzym relevante Peptidsollbruchstelle enthält, kann auch so aufgebaut sein, daß die
30 Peptidsollbruchstelle mehrfach wiederholt wird, wie beispielsweise durch:

-Gly-Pro-**Leu**-Gly — Ile-Ala-Gly-Gln-Gly-Pro-**Leu**-Gly — Ile-Ala-Gly-Gln

oder

-Phe-Lys-Phe-Lys-Phe-Lys-Phe-Lys-Phe-Lys-

- 5 oder es kann eine repetitive Peptidsequenz integriert werden, die den Abstand zwischen dem proteinbindenden Molekül und der relevanten Peptidsollbruchstelle vergrößert, wie beispielsweise durch:

-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Phe-Lys-Phe-Lys-

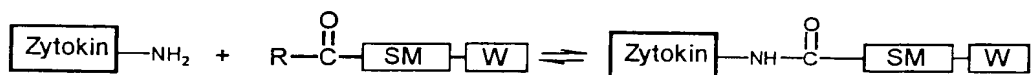
10

Entscheidend für die pharmakologisch aktiven Substanzen zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung ist die Tatsache, daß die für das jeweilige Targetenzym relevante Peptidsollbruchstelle mindestens einmal in einem Oligopeptid vorkommt. Die oben aufgeführten Oligopeptide sind repräsentative Beispiele für die Herstellung von pharmakologisch aktiven Substanzen.

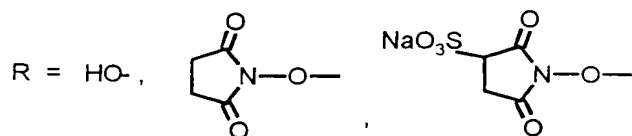
15

20

Pharmakologisch aktive Substanzen für die vorliegende Erfindung, die ein Zytokin enthalten, können dadurch hergestellt werden, daß das Zytokin mit einem eine proteinbindende Gruppe enthaltenen Spacermolekül, das eine Carbonsäure oder eine aktivierte Carbonsäure aufweist, umgesetzt wird:



25



30

Weist das Spacermolekül eine N-Hydroxysuccinimidester-Gruppe (N-Hydroxysuccinimid oder N-Hydroxysuccinimid-3-sulfonsäure Natriumsalz) auf, wird es direkt mit dem Zytokin umgesetzt. Die Umsetzung des Zytokins

mit einem eine proteinbindenden Gruppe enthaltenen Spacermolekül, das eine Carbonsäure aufweist, erfolgt in der Gegenwart eines Kondensationsmittels, wie zum Beispiel. N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) oder N-Cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)-carbodiimid Metho-p-toluolsulfonat (CMC), und gegebenenfalls unter Zusatz von N-Hydroxysuccinimid oder N-Hydroxysuccinimid-3-sulfonsäure Natriumsalz, zu den entsprechenden proteinbindenden Zytokinderivaten. Die Aufreinigung der so derivatisierten Zytokine erfolgt zweckmäßig mit Hilfe der Ausschlußchromatographie. Die oben beschriebenen Umsetzungen sind dem Fachmann geläufig (Bioconjugate Techniques, G.T. Hermanson, Academic Press, 1996).

Im Anschluß an die Synthese der pharmakologisch aktiven Substanz wird eine injizierbare Arzneimittelzubereitung, enthaltend die pharmakologisch aktive Substanz, in einer geeigneten Trägerflüssigkeit hergestellt. Die pharmakologisch aktive Substanz liegt bevorzugt als Lyophilisat vor, wobei vor oder nach dem Lyophilisieren übliche Träger und/oder pharmazeutische Hilfsstoffe, wie etwa oder Polysorbate, Glucose, Lactose, Mannose, Citronensäure, Tromethamol, Triethanolamin oder Aminoessigsäure beigefügt sein können. Die injizierbare Arzneimittelzubereitung muß so hergestellt werden, daß das proteinbindende Molekül durch das Lösen in der injizierbaren Trägerflüssigkeit nicht deaktiviert, abgespalten oder hydrolysiert wird. Weiterhin muß gewährleistet werden, daß die säurelabile Bindung in der pharmakologisch aktiven Substanz, die eine Ester-, Acetal-, Ketal-, Imin-, Hydrazon, Carboxylhydrazon- oder Sulfonylhydrazonbindung ist, nicht hydrolysiert wird. Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendeten proteinbindenden Moleküle sind basenempfindlich, so daß der pH-Wert der Trägerflüssigkeit einen pH-Wert von 8,0 nicht überschreiten soll. Bevorzugt liegt der pH-Wert im Bereich von pH 4,0-7,0, mehr bevorzugt zwischen pH 6,0 und pH 7,0. Außerdem muß die Trägerflüssigkeit natürlich physiologisch verträglich sein.

Bevorzugte Trägerflüssigkeiten sind annähernd isotonische Salzpuffer, z.B. Phosphat-, Acetat- oder Citratpuffer, wie etwa, 0.004 M Natriumphosphat, 0.15 M NaCl - pH 6,0-7,0 oder 0.01 M Natriumacetat, 0.14 M NaCl - pH 5,0-6,5). Die verwendete Trägerflüssigkeit kann auch eine isotonische Natriumchloridlösung sein. Die Salzpuffer können übliche Träger und/oder Hilfsstoffe, wie etwa Polysorbate, Glucose, Lactose, Mannose, Citronensäure, Tromethamol, Triethanolamin oder Aminoessigsäure enthalten.

Die Löslichkeit der pharmakologisch aktive Substanz in der injizierbaren Trägerflüssigkeit kann durch pharmazeutische Lösungsmittel, wie etwa Ethanol, Isopropanol, 1,2-Propylenglykol, Glycerol, Macrogole, Polyethylenglykole bzw. Polyethylenoxide oder durch Lösungsvermittler, z.B. Tween, Cremophor oder Polyvinylpyrrolidon, verbessert werden. Zu diesem Zweck wird die pharmakologisch aktive Substanz entweder in dem pharmazeutischen Lösungsmittel bzw. Lösungsvermittler gelöst und anschließend mit einem Salzpuffer verdünnt oder eine Trägerflüssigkeit, enthaltend den Salzpuffer und mindestens ein pharmazeutisches Lösungsmittel bzw. Lösungsvermittler, wird zum Lösen der pharmakologisch aktiven Substanz direkt verwendet. Die Konzentration der pharmazeutischen Lösungsmittel bzw. Lösungsvermittler überschreiten dabei nicht die Mengen, die vom Arzneimittelgesetz (AMG) vorgeschrieben sind.

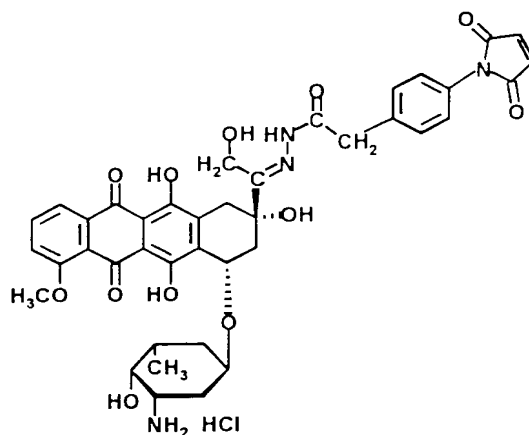
Vorzugsweise sollte die Trägerflüssigkeit so ausgewählt werden, daß der Lösevorgang der pharmakologisch aktiven Substanz in der Trägerflüssigkeit nach wenigen Minuten abgeschlossen ist, so daß eine injizierbare Arzneimittelzubereitung am Krankenbett zur Verfügung gestellt wird.

Das folgende Beispiel erläutert die Erfindung näher.

30

Ausführungsbeispiel

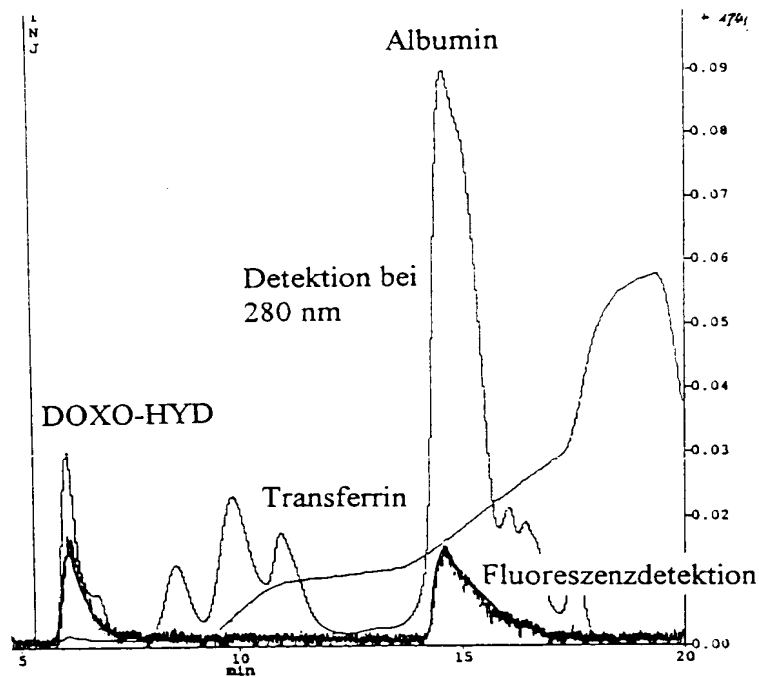
Die im folgenden abgebildete pharmakologisch aktive Substanz (abgekürzt DOXO-HYD) besteht aus dem Zytostatikum Doxorubicin, aus einer Maleinimidgruppe als proteinbindendes Molekül PM und aus einem Phenylacetylhydrazonspacer als Spacermolekül SM. Die Bindung zwischen
5 Doxorubicin und dem Spacermolekül SM ist eine säurelabile Carboxylhydrazonbindung:



10,51 mg DOXO-HYD werden in 2,0 ml 1,2-Propylenglykol durch Schütteln gelöst und anschließend wird diese Lösung mit 8,0 ml Phosphatpuffer (0.004 M Natriumphosphat, 0.15 M NaCl - pH 6,5) verdünnt und
25 homogenisiert (Konzentration von DOXO-HYD in der Trägerflüssigkeit \approx 1300 μ M). Die so hergestellte injizierbare Arzneimittelzubereitung von DOXO-HYD wurde Versuchstieren unmittelbar intravenös verabreicht (siehe unten).

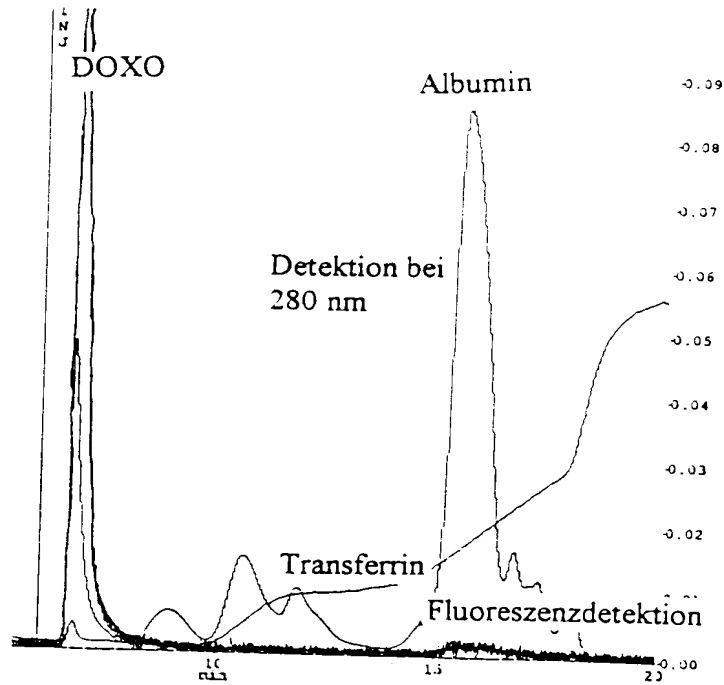
30 Nachdem DOXO-HYD in die Blutbahn gelangt, findet eine Bindung an Serumproteine statt, vorzugsweise an Serumalbumin, so daß DOXO-HYD

u.a. als säurelabiles Albumin-Doxorubicin-Konjugat vorliegt. Inkubationsstudien von Humanserum mit DOXO-HYD zeigen, daß eine 10minütige Inkubation von Humanserum mit dem Doxorubicin-Maleinimid-Spacer DOXO-HYD zu einer etwa 60%igen Bindung an Serumalbumin führt, wie im folgenden Chromatogramm dargestellt ist:



Hierbei wurde nach erfolgter Inkubation die Serumprobe über eine Anionenaustauschersäule im Niederdruckbereich (FPLC) getrennt (Detektion der Proteine bei 280 nm, Detektion des Doxorubicins mittels Fluoreszenzdetektor, Peak des Albumins bei 15 min; Peak von DOXO-HYD bei 6 min).

Inkubation mit freiem Doxorubicin unter identischen Bedingungen führt hingegen zu keiner Bindung an Serumalbumin, wie im folgenden Chromatogramm dargestellt ist:



Die therapeutischen Vorteile von DOXO-HYD gegenüber der Muttersubstanz Doxorubicin werden durch folgende tierexperimentelle Daten dargelegt:

5 **Tiere:** Ncr:nu/nu weiblich; **Tumor:** Mammakarzinom MX1 s.c.

Therapie: Tag(d) 1, Tag(d) 15 i.v.

A n z a h l d e r Tumoren	Substanz	Dosis (mg/Kg/inj.)	Mortalität (d)	K ö r p e r g e - wichtsverlust (%)	T/C (%) nach 30 Tagen
12	NaCl			5	
12	Doxorubicin	8		-15	110
12	DOXO-HYD	16		-13	29

15

Die Dosis bezieht sich auf die vorhandene Menge Doxorubicin. Die Muttersubstanz Doxorubicin kann selbst bei optimaler Dosierung (2 x 8 mg/kg; Körpergewichtsreduktion -15%) die Größe der Ausgangstumoren in diesem Xenograftmodell nicht verringern.

20

Die äquitoxische Dosis (2 x 16 mg/kg; Körpergewichtsreduktion -13%) von DOXO-HYD führt hingegen zu einer etwa 70 %-igen Reduktion der Tumorgroße.

25

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung einer injizierbaren Arzneimittelzubereitung, enthaltend eine pharmakologisch aktive Substanz, die in einer injizierbaren Trägerflüssigkeit gelöst wird, **dadurch gekennzeichnet**, daß als pharmakologisch aktive Substanz eine Verbindung bestehend aus einem Wirkstoff, und wenigstens einem proteinbindenden Molekülrest, die durch einen Spacer verbunden sind, verwendet wird, worin der Spacer oder die Bindung zwischen dem Wirkstoff und dem Spacer pH-abhängig oder enzymatisch im Körper spaltbar ist unter Freisetzung des Wirkstoffs.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Wirkstoff ein Zytostatikum, ein Zytokin, ein Immunsuppressivum, ein Virostatikum, ein Antirheumatikum, ein Analgetikum, ein Antibiotikum oder ein Antimykotikum ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Wirkstoff aus der Gruppe der Anthrazykline, der Stickstofflostderivate, der Alkylantien, der Purin- oder Pyrimidinantagonisten, der Folsäureantagonisten, der Taxane, der Camptothecine, der Podophyllotoxinderivate, der Vinca-Alkaloide oder der *cis*-konfigurierten Platin(II)-Komplexe ausgewählt ist.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß das proteinbindende Molekül eine Maleinimidgruppe, eine Halogenacetamidgruppe, eine Halogenacetatgruppe, eine Pyridyldithio-Gruppe, eine N-

Hydroxysuccinimidester- oder eine Isothiocyanat-Gruppe ist, die gegebenenfalls substituiert sein kann.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Spacer ein organischer Molekülrest ist, welcher eine aliphatische Kohlenstoffkette mit 1-12 Kohlenstoffatomen die teilweise durch Sauerstoffatome ersetzt sein können und/oder mindestens einem Aromaten enthält, welche gegebenenfalls substituiert sein können.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Bindung zwischen dem Wirkstoff und dem Spacer bzw. der proteinbindenden Molekülrest mindestens eine Peptidbindung enthält.
7. Pharmakologisch aktive Substanz mit Gehalt an wenigstens einem Wirkstoff, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie wenigstens einen proteinbindenden Molekülrest aufweist, welcher mit dem Wirkstoff durch einen Spacer verbunden ist, welcher selbst oder die Bindung zwischen Spacer und Wirkstoff pH-abhängig oder enzymatisch im Körper spaltbar ist unter Freisetzung des Wirkstoffs, wobei der Wirkstoff kein Zytostatikum ist.
8. Verwendung der pharmakologisch aktiven Substanz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Behandlung von Krebskrankheiten, Viruskrankheiten, Autoimmunerkrankungen, akute oder chronisch-entzündliche Erkrankungen und Erkrankungen, die durch Bakterien, Pilze oder andere Mikroorganismen verursacht sind.